

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian pada penelitian ini adalah penelitian komparatif atau studi perbandingan yang merupakan bentuk dari penelitian deskriptif yang membandingkan dua atau lebih dari dua situasi, kejadian, kegiatan, program, dan lain-lain yang sejenis atau hampir sama. Hasil penelitian akan dianalisis untuk dapat ditemukan faktor-faktor dominan yang melatarbelakangi atau diakibatkan oleh suatu situasi atau kejadian (Sukmadinata, 2007).

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Tempat uji dalam penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga dan di Laboratorium Kimia Universitas Brawijaya Malang

3.2.2. Waktu Pelaksanaan Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada tanggal 12 Februari 2018–12 Maret 2018.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi adalah keseluruhan objek yang diteliti yang memiliki kualitas dan karakter tertentu yang ditentukan oleh peneliti (Sugiyono, 2016). Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh Ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) segar dan asap.

3.3.2 Sampel

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Bila populasi besar, dan penelitian tidak mungkin mempelajari semua yang ada pada populasi, misal dikarenakan keterbatasan dana, tenaga, dan waktu, maka peneliti dapat menggunakan sampel yang diambil dari populasi. Hasil yang dipelajari dari sampel itu, kesimpulannya akan diberlakukan untuk populasi. Untuk itu sampel yang diambil dari populasi harus betul-betul representatif atau mewakili (Sugiyono, 2016).

Sampel yang digunakan dalam penelitian di ambil dari 4 pedagang yang menjual ikan segar dan 4 pedagang yang menjual ikan asap, selanjutnya setiap pedagang diambil 3 ikan tongkol. Adapun total sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 sampel yang didapatkan dari pedagang secara acak yang ada di jalan raya kabupaten Tuban.

3.3.3 Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan yaitu *simple random sampling* , karena pengambilan anggota sampel dari populasi dilakukan secara acak tanpa memperhatikan strata yang ada dalam populasi itu, cara demikian dilakukan bila anggota populasi dianggap homogeny (Sugiono, 2016). Sehingga dalam pengambilan sampel di pedagang ikan tongkol segar dan asap kemudian yang diteliti adalah adanya timbal (Pb) dan adanya mikroba. Berdasarkan pada teknik sampling yang di gunakan maka pengambilan sampel berada di sepanjang jalan raya desa Karang sari kecamatan Tuban Kabupaten Tuban.

3.4 Variabel Penelitian dan Devinisi Operasional

Variabel penelitian adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga diperoleh suatu informasi untuk hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2016). Variabel pada penelitian ini adalah kandungan timbal (Pb) dan mikroba pada ikan tongkol segar dan asap.

3.4.1 Devinisi Operasional

- a. Lokasi yang dipilih untuk pengambilan sampel merupakan lokasi yang dekat dengan laut pantai utara Tuban yang menjadi sumber tercemarnya logam berat timbal (Pb) dan menjadi tempat pengolahan ikan dengan cara pengasapan secara tradisional yang merupakan penyebab dari tercemarnya bakteri yang merugikan. Lokasi yang dipilih adalah sepanjang jalan Raya desa Karangsari Kecamatan Tuban Kabupaten Tuban.
- b. Kandungan timbal (Pb) dalam penelitian ini adalah timbal yang terdapat pada ikan tongkol segar dan ikan asap yang kemudian akan diukur kadarnya menggunakan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA).
- c. Kontaminasi mikroba pada ikan tongkol segar dan asap yang akan diteliti dengan metode *Total Plate Count* (TPC).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Alat dan bahan

- A. Alat dan bahan penelitian kandungan timbal (Pb) dengan metode SSA

1. Alat

- a. Aluminium foil
- m. Mikropipet

- | | |
|---|--|
| b. Gelas beaker 25 ml, 100 ml dan 250 ml | n. Oven |
| c. <i>Blender/homogenizer</i> | o. Pipet tetes |
| d. Botol <i>polypropylene</i> | p. Pipet volumetrik 10 ml, 5 ml dan 1 ml |
| e. Cawan porselen bertutup | q. Pisau |
| f. Corong plastik | r. <i>Refrigerator</i> atau <i>freezer</i> |
| g. Desikator | s. Sendok plastik |
| h. Gelas ukur 25 ml dan 50 ml | t. Seperangkat |
| i. <i>Hot plate</i> | u. Timbangan analitik dengan ketelitian $\pm 0,0001$ g |
| j. Labu takar 50 ml (<i>polypropylene</i>) dan 1 000 ml | v. Tungku pengabuan (<i>furnace</i>) |
| k. Labu takar 100 ml | w. Wadah <i>polystyrene</i> . |
| l. <i>Microwave</i> , khusus untuk destruksi contoh pengujian logam | |

2. Bahan

- HCl 37 %;
- HCl 6 M (Encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air deionisasi dan tepatkan hingga 1 000 ml)
- HNO₃ 65 %;
- HNO₃ 0,1 M; (Encerkan 7 ml HNO₃ 65 % dengan air deionisasi dan tepatkan hingga 1 000 ml)
- NH₄H₂PO₄; Larutan NH₄H₂PO₄ 40 mg/ml (sebagai matrik modifier)
 - Timbang 2,42 g NH₄H₂PO₄ larutkan dengan air deionisasi di dalam gelas beaker setelah larut dengan sempurna pindahkan ke dalam labu takar 50 ml dan tepatkan sampai garis batas.

f. Larutan standar Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd);

1. Larutan standar primer 1 000 mg/l.
2. Larutan standar sekunder pertama : 10 mg/l.
3. Pipet 1 ml larutan standar primer 1 000 mg/l, masukkan ke dalam labu takar 100 ml dan encerkan dengan larutan HNO₃ 0,1 M. Larutan standar ini dapat disimpan selama 1 bulan di dalam botol *polypropylene*.
4. Larutan standar sekunder kedua : 1 mg/l.
5. Pipet 5 ml dari larutan sekunder pertama masukkan kedalam labu takar 50 ml dan encerkan dengan larutan HNO₃ 0,1 M. Larutan standar ini dapat disimpan selama 1 bulan di dalam botol *polypropylene*.
6. Larutan standar sekunder ketiga: 100 µg/l.
7. Pipet 5 ml dari larutan standar ke dua sekunder masukkan ke dalam labu takar 50 ml dan encerkan dengan larutan HNO₃ 0,1 M. Larutan standar ini dapat disimpan selama 1 minggu di dalam botol *polypropylene*.
8. Larutan standar kerja dibuat dari larutan standar sekunder ke-tiga yang konsentrasinya disesuaikan dengan daerah kerja alat AAS yang digunakan untuk logam Pb umumnya pada kisaran konsentrasi 1 µg/l – 20 µg/l dan untuk logam Cd pada kisaran konsentrasi 1 µg/l – 10 µg/l, larutan standar kerja ini harus dibuat ketika akan melakukan analisa.

B. Alat dan bahan penelitian kontaminasi mikroba dengan metode TPC

1. Alat

- a) *Autoclave*
- b) botol pengencer/tabung reaksi

- c) kapas pengusap steril (*sterile cotton swab*).
- d) Cawan
- e) Bunsen
- f) Elenmeyer

2. Bahan

- a. Sampel Ikan segar dan asap
- b. larutan pepton 1 % atau larutan garam steril 0,85 %
- c. Plate Count Agar
- d. larutan Butterfield's phosphate buffered.

3.5.2 Prosedur Kerja Uji SSA dan TPC

A. Uji timbal dengan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom) SNI 2011

- 1) Pengabuan kering (*dry ashing*)
 - a) Timbang produk basah sebanyak 5 gram atau produk kering sebanyak 0,5 g dalam cawan porselen dan catat beratnya (W)
 - b) Buat kontrol positif Pb dan Cd
 - c) Uapkan spiked di atas hot plate pada suhu 100 °C sampai kering.
 - d) Masukkan contoh dan spiked kedalam tungku pengabuan dan tutup separuh permukaannya. Naikkan suhu tungku pengabuan secara bertahap 100 °C setiap 30 menit sampai mencapai 450 °C dan pertahankan selama 18 jam
 - e) Keluarkan contoh dan spiked dari tungku pengabuan dan dinginkan pada suhu kamar. Setelah dingin tambahkan 1 ml HNO₃ 65 %, goyangkan secara hati-hati sehingga semua abu terlarut dalam asam dan selanjutnya uapkan diatas hot plate pada suhu 100 °C sampai kering

- f) Setelah kering masukkan kembali contoh dan spiked ke dalam tungku pengabuan Naikkan suhu secara bertahap 100 °C setiap 30 menit sampai mencapai 450 °C dan pertahankan selama 3 jam
- g) Setelah abu terbentuk sempurna berwarna putih, dinginkan contoh dan spiked pada suhu ruang. Tambahkan 5 ml HCl 6 M kedalam masing-masing contoh dan spiked, goyangkan secara hati – hati sehingga semua abu larut dalam asam. Uapkan diatas hot plate pada suhu 100 °C sampai kering
- h) Tambahkan 10 ml HNO₃ 0,1 M dan dinginkan pada suhu ruang selama 1 jam, pindahkan larutan ke dalam labu takar polypropylene 50 ml dan tambahkan larutan matrik modifier, tepatkan sampai tanda batas dengan menggunakan HNO₃ 0,1 M
- 2) Destruksi basah menggunakan microwave
- a) Timbang contoh basah sebanyak 2 g atau contoh kering sebanyak 0,2 g – 0,5 g ke dalam tabung sampel (vessel) kemudian dicatat beratnya (W).
- b) Untuk kontrol positif (spiked 0,1 mg/kg), tambahkan masing – masing 0,2 ml larutan standar Pb dan Cd 1 mg/l atau larutan standar Pb dan Cd 200 µg/l sebanyak 1 ml ke dalam contoh kemudian di vortex
- c) Tambahkan secara berurutan 5 ml – 10 ml HNO₃ 65 % dan 2 ml H₂O₂
- d) Lakukan destruksi dengan mengatur program microwave (sesuaikan dengan microwave yang digunakan)
- e) Pindahkan hasil destruksi ke labu takar 50 ml dan tambahkan larutan matrik modifier, tepatkan sampai tanda batas dengan air deionisasi

3) Pembacaan kurva kalibrasi dan contoh pada AAS

- a) Siapkan larutan standar kerja Pb dan Cd masing – masing minimal 5 (lima) titik konsentrasi
- b) Baca larutan standar kerja, contoh dan spiked pada alat spektrofotometer serapan atom graphite furnace pada panjang gelombang 283,3 nm untuk Pb dan 228,8 nm untuk Cd

B. Prosedur kerja Untuk Uji TPC (*Total Plate Count*)

1. Pengambilan sampel

Peneliti mengambil sampel dari kota Tuban dan di bawa ke Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga, sampel yang di ambil harus dimasukkan kedalam box dingin dan steril karena menempuh perjalanan selama 3 jam.

2. Proses Sterilisasi

- a. Menyiapkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan
- b. Membungkus alat berbahan kaca dengna menggunakan kertas
- c. Mengisi panci autoklaf dengan air kran setinggi batas sarangan
- d. Mengolesi vaselin secara merata pada tepi autoklaf
- e. Memasukkan semua alat ke dalam autoklaf, kemudian menutupnya
- f. Meletakkan autoklaf pada kompor yang sudah menyala, dengan mengatur katup air pada autoklaf
- g. Sampai keluar uap dari celah katup, kemudian melipat katup hingga dalam posisi datar
- h. Menunggu hingga jarum manometer menunjukan angka 15, menunjukkan autoklaf telah mencapai 15 lbs

- i. Mematikan api, kemudian menunggu hingga 15 menit supaya tekanan pada manometer kembali pada 0 lbs
- j. Menegakkan katup air supaya uap air keluar, kemudian alat yang sudah disterilkan dikeluarkan

3. Pembuatan Media NA

4. Proses inokulasi

- a. Menimbang sampel setelah dihaluskan sebanyak 25 gram
- b. Menambahkan sampel kedalam tabung reaksi berisi NaCl
- c. Menghomogenkan sampel menggunakan vortex
- d. Melakukan pengenceran bertingkat
- e. Menuangkan sampel sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri
- f. Melakukan homogenitas dengan memutar cawan
- g. Menunggu biakan hingga padat

5. Proses Inkubasi

- a. Memasukkan cawan petri yang sudah berisi biakan bakteri ke dalam inkubator dengan suhu 37 °C
- b. Membiarkan biakan selama 2x24 jam

6. Pembacaan Hasil

- a. Mengeluarkan biakan dalam cawan petri dari inkubator
- b. Menghitung jumlah koloni biakan pada media

3.6 Teknik Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian tentang kandungan timbal (Pb) pada ikan tongkol segar dan asap di laboratorium Universitas Brawijaya Malang

dengan metode SSA, dan kontaminasi mikroba pada ikan tongkol asap dari Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang dengan metode angka lempeng total (ALT) atau TPC. Kemudian akan disajikan dalam table berikut.

Table 3.1 Rata-Rata Kandungan Timbal (Pb) Pada Ikan Segar dan Asap (ppm)

No	Sampel	Ulangan	Kandungan Pb (mg/kg)	Rata-rata	Batas Maksimum SNI:2009(0,3 mg/kg)
1	IkanTongkol Segar	1A1			
		1A2			
		1A3			
		2A1			
		2A2			
		2A3			
		3A1			
		3A2			
		3A3			
		4A1			
		4A2			
		4A3			
2	IkanTongkol Asap	1B1			
		1B2			
		1B3			
		2B1			
		2B2			
		2B3			
		3B1			
		3B2			
		3B3			
		4B1			
		4B2			
		4B3			

Table 3.2 Rata-Rata Kontaminasi Mikroba Pada Ikan Segar Dan Asap (CFU/ml)

No	Sampel	Ulangan	Hasil TPC (cfu/ml)	Rata-rata	Batas Maksimum SNI:2009 (5×10^5 Cfu/g)
1	Ikan Tongkol Segar	1A1			
		1A2			
		1A3			
		2A1			
		2A2			
		2A3			
		3A1			
		3A2			
		3A3			
		4A1			
		4A2			
		4A3			
2	Ikan Tongkol Asap	1B1			
		1B2			
		1B3			
		2B1			
		2B2			
		2B3			
		3B1			
		3B2			
		3B3			
		4B1			
		4B2			
		4B3			

3.7 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara kuantitatif. Data yang diperoleh dari Laboratorium dengan metode SSA dan TPC selanjutnya dianalisis menggunakan uji t tidak berpasangan (*Independent Sample t test*). Sebelum melakukan uji t tersebut dilakukan uji normalitas menggunakan uji Shapiro-wilk. Bila data tidak normal, maka uji dilakukan menggunakan uji non parametik menggunakan Maan-Whitney, sebesar tingkat kepercayaan (α) pada penelitian ini adalah 0,05. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 21.

Hipotesis statistika untuk penelitian ini yaitu sebagai berikut.

- a. H_a : Terdapat perbedaan antara rata-rata kandungan timbal pada ikan segar dan asap di jalan raya kabupaten Tuban
- b. H_a : Terdapat perbedaan antara rata-rata kontaminasi mikroba pada ikan segar dan asap di jalan raya kabupaten Tuban

Selain pengujian dengan SPSS, data hasil penelitian juga akan disesuaikan dengan ketentuan BPOM RI tahun 2009 mengenai cemaran logam berat dan mikroba pada pangan dan minuman